

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intellectual  
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional  
19 de Septiembre de 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 02/072800 A1(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12N 5/08,  
A61L 27/60, A61F 2/10

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00087

(22) Fecha de presentación internacional:  
28 de Febrero de 2002 (28.02.2002)

(25) Idioma de presentación: español

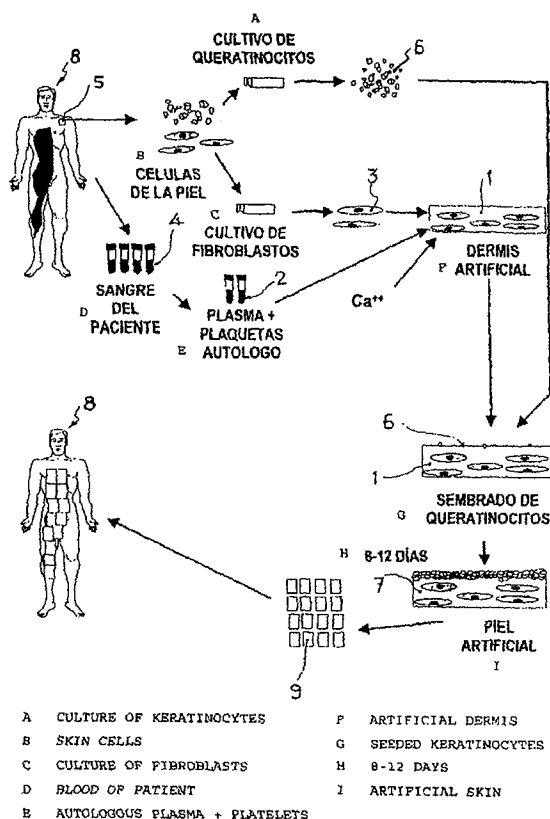
(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 200100494 1 de Marzo de 2001 (01.03.2001) ES(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo  
US): CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGET-  
ICAS MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLOGICAS  
(C.I.E.M.A.T.) [ES/ES]; Avenida Complutense, 22,  
E-28040 Madrid (ES). CENTRO COMUNITARIO  
DE TRANSFUSION DE ASTURIAS-CRUZ ROJA  
ESPAÑOLA [ES/ES]; Emilio Rodríguez Vigil, E-33006  
Oviedo (Asturias) (ES). FUNDACION MARCELINO  
BOTIN [ES/ES]; Pedruca, 1, E-39003 Santander (ES).(72) Inventores; e  
(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): JOR-  
CANO NOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Avenida Com-  
plutense, 22, E-28040 Madrid (ES). LARCHER

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ARTIFICIAL DERMIS AND PRODUCTION METHOD THEREFOR

(54) Título: DERMIS ARTIFICIAL Y METODO DE OBTENCION



(57) Abstract: The invention relates to an artificial dermis (1) obtained from plasma containing platelets (2) and human fibroblasts (3). Said plasma with platelets (2) is obtained by fractionating the whole blood (4) of the patient (8) by means of light centrifugation and the human fibroblasts (3) are obtained from a skin biopsy (5). The gelation is obtained by adding calcium. The inventive artificial dermis (1) favours a rapid growth of the keratinocytes (6) seeded on the surface thereof in order to form an artificial skin (7) that can be easily transplanted. Large areas of artificial dermis (1) are obtained from a small skin biopsy (5) and from minimum quantities of plasma with platelets (2). Said plasma is rich in cytokines and in platelet growth factors and therefore stimulates the proliferation of the seeded cells, both internally and on the surface. The artificial skin (7) thus produced can be used for the treatment of serious burns, chronic cutaneous ulcers, etc. or as a base for gene therapy through the use of genetically modified cells.

(57) Resumen: Dermis artificial (1) obtenida a partir de plasma con plaquetas (2) y fibroblastos (3) humanos. El plasma con plaquetas (2) se obtiene por fraccionamiento de la sangre total (4) del paciente (8) mediante centrifugación ligera, y los fibroblastos (3) humanos a partir de una biopsia de piel (5). La gelificación se consigue mediante la adición de calcio. Esta dermis artificial (1) permite un crecimiento rápido de los queratinocitos (6) sembrados en su superficie para constituir una piel artificial (7) que es fácilmente trasplantable. Se consiguen grandes superficies de dermis artificial (1) a partir de una pequeña biopsia de piel (5) y de cantidades mínimas de plasma con plaquetas (2), que al estar enriquecido en citoquinas y factores de crecimiento

[Continúa en la página siguiente]



## **DERMIS ARTIFICIAL Y METODO DE OBTENCION**

### **Objeto y campo de aplicación**

La presente invención se refiere a una dermis artificial realizada por gelificación de plasma en presencia de plaquetas, mediante la adición de calcio y en la que se siembran fibroblastos u otras células dérmicas. En la superficie de esta dermis artificial pueden sembrarse, a su vez, queratinocitos lo que la hace especialmente útil como piel artificial para el tratamiento de grandes quemados, úlceras crónicas, ensayos de susceptibilidad a diversos productos etc. Mediante el empleo de células genéticamente modificadas puede utilizarse como base para terapia génica.

### **10 Antecedentes de la invención**

La piel es un tejido compuesto por dos partes, el epitelio o parte externa y la dermis o parte interna sobre la que está situada el epitelio. Estas dos partes se diferencian claramente por sus características, en la epidermis no existe casi tejido extracelular, mientras que la dermis predomina claramente este componente frente a las células.

15 La piel es un tejido que se puede reconstruir mediante técnicas de ingeniería tisular (Parenteau N, Sci Am, 280: 83-84, 1999). En estas técnicas, en general, el componente celular se genera "ex vivo" mediante técnicas de cultivo celular. Estas técnicas permiten, a partir de un corto número de células extraídas de una pequeña biopsia cutánea, conseguir en un periodo de tiempo corto un gran número de células.

20 Estas células expandidas "ex vivo" pueden ser empleadas en la construcción de grandes superficies de piel artificial. La matriz extracelular no puede ser producida mediante cultivo celular, sino que es previamente diseñada y fabricada fuera del organismo. La matriz extracelular tiene que ser capaz de proporcionar estructuras que faciliten la adhesión de las células dérmicas previamente cultivadas y estimular el

25 crecimiento normal de estas células. Sobre esta matriz artificial, las células comienzan a fabricar las proteínas normales que constituyen la matriz dérmica natural y, al mismo tiempo, van degradando lentamente la estructura original, de manera que a lo largo del tiempo esta matriz artificial suministrada sea sustituida por una verdadera matriz extracelular en todo similar a la natural. Sobre esta matriz

30 artificial se pueden sembrar las células epiteliales previamente cultivadas (queratinocitos en el caso de la piel), donde por nuevas técnicas de cultivo celular estas células son capaces de generar una estructura muy similar al epitelio normal de donde se originaron. En resumen, una de las claves en la ingeniería tisular de la piel es el diseño de matrices dérmicas que imiten lo más posible las condiciones

35 naturales del organismo y donde las células introducidas en la misma sean capaces

de iniciar un proceso complejo, cuyo fin es el desarrollar una estructura lo más similar posible a la piel natural. La otra clave importante en la ingeniería tisular de la piel es la capacidad de la matriz dérmica para facilitar el crecimiento de las células sembradas en ella. El desarrollar matrices dérmicas que fomenten el crecimiento de las células tanto dérmicas como epidérmicas, conseguiría que a partir de una mínima biopsia se puedan cultivar grandes superficies de piel artificial. Este hecho tiene especial importancia cuando la piel artificial está destinada a tratamiento de grandes quemados en los que hay que reponer lo más rápidamente posible hasta el 90-95 % de la superficie corporal total a partir de las escasas zonas de piel sana que le quedan al paciente. La escasez de matrices dérmicas capaces de generar estas amplias superficies de piel artificial a partir de mínimas biopsias, constituye una de las limitaciones que presentan muchas matrices dérmicas previamente descritas (Sheridan R and Tompkins, Burns 25:97-103, 1999).

Existen varios modelos de dermis artificiales. Algunos de los modelos previamente utilizados se describen sucintamente:

- Colágeno tipo I de procedencia animal, ya que esta proteína es la más abundante de las presentes en la dermis (Maraguchi T et al. Plast Reconstr Surg, 93:537-544, 1994, Muhart et al. Arch Dermatol, 135: 913-918, 1999).
  - Condroitin sulfato (Boyce S et al. Surgery, 103: 421-431, 1988).
  - Nylon asociado o no a una membrana impermeable de Sylastic (Naughton y Mansbridge, Clin Plast Surg, 26:579-586, 1999).
  - Poli-lactide/poli-glicolide (Giardino et al, J Trauma 47: 303-308, 1999), estos polímeros forman una red que sirve como estructura donde los fibroblastos prenden, crecen y son capaces de segregar proteínas de la matriz dérmica normal.
  - Fibrina, esta proteína cuyo precursor el fibrinógeno se obtiene a partir de plasma humano, ha sido utilizada de diversas maneras en el cultivo de queratinocitos. La fibrina proporciona una buena base para el crecimiento de las células epiteliales, por lo que esta proteína ha sido utilizada como soporte inerte sobre el cual cultivar los queratinocitos (Ronfard et al, Burns 17:181-184, 1991) (*Broly et al, ES2060803*). La fibrina no interfiere con el posterior desarrollo de una correcta unión dermo/epidérmica entre el lecho de la herida y los queratinocitos cultivados. Estas características hacen que la fibrina haya sido ampliamente utilizada como sistema de transporte para los queratinocitos (Pellegrini et al, Transplantation 68:868-879, 1999; Kaiser y Stark, Burns 20. 23-29, 1994).
- La fibrina y/o los geles realizados tras la coagulación de las proteínas del plasma

Humano han sido utilizados como vehículo para trasplantar células cutáneas previamente expandidas "in vitro". (Sadaki I, JP10277143).

La fibrina puede ser también utilizada como base dérmica destinada a la producción de grandes superficies de piel cultivada (Meana et al, Burns 24: 621-630, 1998). En el interior de los geles de fibrina los fibroblastos sembrados son capaces de crecer. Al mismo tiempo estos fibroblastos se comportan como auténticos inductores del crecimiento de los queratinocitos, de forma que sembrando un número muy limitado de queratinocitos cultivados sobre un gel de fibrina y fibroblastos se obtiene en 8-12 días de cultivo un epitelio confluyente estratificado que remeda el epitelio humano normal. Esta capacidad de los geles de fibrina para que las células epiteliales se desarrollen ha sido utilizada en otro modelo de piel artificial (Meana et al, P9701533). Además la fibrina puede utilizarse en presencia de otros componentes que aumenten la rigidez de la misma y faciliten su uso como soporte dérmico (Meana A, P9601684.). Esta capacidad de los geles de fibrina y fibroblastos para conseguir grandes superficies de piel artificial a partir de una mínima biopsia cutánea no la presentan los modelos basados en dermis artificiales de composición diferente. La explicación a este hecho es que los geles basados en fibrina imitan más el mecanismo fisiológico de reparación de heridas (Martín P, Science 276: 75-81, 1997).

Sin embargo, la fabricación de la matriz dérmica a base de concentrados de fibrina es solamente una imitación del proceso fisiológico. El verdadero coágulo de fibrina que se forma como parte del mecanismo de defensa y reparación tisular, se realiza a expensas del plasma sanguíneo. En la fracción extracelular de la sangre existen múltiples proteínas, una de ellas, el fibrinógeno, es el precursor soluble de la fibrina, principal proteína, aunque no única del coágulo. La extravasación del plasma tras la agresión de un tejido es una de las maneras de desencadenar toda la cascada de la coagulación. Cuando la agresión se produce y los productos tisulares entran en contacto con la sangre, se activa la denominada vía extrínseca de la coagulación, el resultado final es la activación del precursor inactivo de la trombina presente en el plasma, esta trombina inicia la conversión de fibrinógeno en fibrina y más tarde en fibrina insoluble que unida a células sanguíneas forman parte del coágulo de fibrina, el primer eslabón para la cura y posterior reparación de la lesión producida en el organismo (Singer y Clark, N Engl J Med, 341:738-746, 1999). De las células que intervienen en la formación del coágulo hay que destacar las plaquetas, estas células son un importante reservorio de citoquinas, sustancias responsables del inicio de la respuesta celular en el proceso de reparación final de las heridas. Las plaquetas

también intervienen en el desarrollo del coágulo de fibrina en el interior de los vasos, es la llamada vía intrínseca de la coagulación, en las que un estímulo provoca el desarrollo de agregado plaquetario que activará una serie de proteínas plasmáticas que a su vez estimularán otras mediante un mecanismo de ampliación de la respuesta en cascada. Al final tendremos la formación de trombina que iniciará la formación del coágulo. En ambos procesos, vía intrínseca y extrínseca de la coagulación, la presencia de iones libres de calcio es imprescindible para completar su desarrollo ya que algunas proteínas de estas vías dependen de este ion para que sean activadas. Tras la formación del coágulo de fibrina a partir del plasma sanguíneo, las citoquinas, inicialmente liberadas por las plaquetas, atraerán a otras células, tipo macrófagos, neutrófilos... que iniciarán el proceso de destrucción del coágulo y sustitución de este tejido fibrinoide por el tejido normal previo a la agresión. Estas células a su vez fabricarán otras citoquinas que mantendrán y controlarán la respuesta a la agresión y atraerán al lecho de la herida a fibroblastos dérmicos y células endoteliales, que completarán la respuesta reparadora. Estas nuevas células reparadoras fabricarán otras citoquinas que atraerán a las células epiteliales a la herida para que recubran toda la superficie de la misma. A su vez las células epiteliales son capaces de fabricar múltiples sustancias que provocan respuestas celulares variadas en las células dérmicas subyacentes, también las células epiteliales tienen una marcada acción lítica sobre el coágulo de fibrina, ya que necesitan penetrar en él y eliminarlo para poder tapizar nuevamente toda la superficie de la herida (Singer y Clark, N Eng J Med 341: 738-746 ,1999). Una vez recubierta la lesión por el epitelio el proceso de curación está finalizado.

Podemos considerar que la reparación fisiológica de una herida se basa en un coágulo de fibrina rico en citoquinas plasmáticas, realizado a partir del fibrinógeno disuelto en el plasma. Este coágulo disparará la respuesta reparadora primaria del organismo y facilitará el terreno para que las células epiteliales próximas, se activen, migren desde los puntos más cercanos a la herida y cierren definitivamente la herida producida. Este proceso reparador tiene unos límites, y en aquellos casos en que la lesión destruye de forma completa y amplía todas las células epiteliales presentes (quemaduras amplias y profundas), es necesario un aporte artificial de epitelio, bien mediante injertos en malla, queratinocitos cultivados, queratinocitos en suspensión o piel artificial cultivada, para que el proceso finalice (Navsaria et al, TIBTECH 13: 91-100, 1995).

Si el origen de la reparación de heridas está en el coágulo de fibrina a partir de

plasma es posible que un modelo de piel artificial basado en el empleo de plasma humano como fuente principal de la matriz extracelular sea de gran eficacia y pueda fomentar extraordinariamente el crecimiento celular, ya que reconstruye las condiciones fisiológicas del proceso de reparación de heridas del organismo.

## 5 Descripción de la invención

En la presente invención se describe el desarrollo de una dermis artificial basada en el empleo de plasma humano como base fundamental de la matriz extracelular. Este plasma humano se obtiene por fraccionamiento primario de la sangre total e incluye en su composición plaquetas. Los fibroblastos dérmicos previamente cultivados se resuspenden en el plasma y tras la coagulación del mismo se obtiene una dermis artificial. Sobre esta dermis artificial posteriormente se sembraran los queratinocitos expandidos "ex vivo". En esta dermis artificial los queratinocitos presentan un comportamiento "in vitro" similar al que presentan "in vivo" en el proceso de reparación de las heridas. Se adhieren, migran y crecen de forma que, a partir de 10 unas pocas células sembradas, en 8-12 días de cultivo recubren toda la superficie del gel de plasma y forman un epitelio estratificado. El resultado final es que a partir de 15 un pequeño número inicial de células sembradas obtenemos días más tarde un tejido constituido por 2 partes, una superior, células epiteliales estratificadas y una inferior constituida por una matriz extracelular densamente poblada de fibroblastos.

20 Estos geles se pueden preparar para trasplante utilizando la técnica previamente descrita (Meana et al, P9701533) y fijándolos a un soporte sólido con lo que potencialmente pueden ser empleados en el tratamiento de lesiones cutáneas. También utilizando un volumen mayor de gel que los habituales, estos geles pueden ser utilizados sin fijación a un soporte sólido, lo que reduce aún más la manipulación 25 de los mismos y el coste final. El trasplante en animales de experimentación de esta piel artificial, demuestra que es capaz de prender cuando se coloca sobre una herida y que además desarrolla todas las capas de la piel humana madura, estrato corneo incluido. Los estudios hasta ahora efectuados demuestran también que la epitelización persiste durante toda la vida del animal. Estos resultados 30 experimentales implican que esta piel artificial puede ser utilizada en la epitelización definitiva de pacientes quemados.

La accesibilidad del material empleado en esta dermis así como su sencilla manipulación implica una importante reducción del coste final del producto que ha sido uno de los factores limitantes para el empleo masivo de la piel cultivada en 35 terapéutica (Phillis TJ, Arch Dermatol 135. 977-978, 1999).

La dermis artificial objeto de la invención comprende un gel producido por la coagulación del plasma humano en presencia de plaquetas, al que previamente se han añadido fibroblastos humanos cultivados. La coagulación se produce mediante la adición de sales de calcio. Alternativamente puede producirse por la transformación  
5 del fibrinógeno contenido en el plasma por trombina exógena e iones  $\text{Ca}^{++}$ .

Dependiendo de la concentración de fibrinógeno en el gel, esta coagulación puede realizarse en presencia o no de agentes que actúen como antifibrinolíticos, recomendándose la adición de los mismos cuando el fibrinógeno sea inferior a 2 mg/ml de gel.

10 La obtención del plasma se realiza por centrifugación ligera de la sangre total extraída mediante venopunción en presencia de anticoagulantes, preferentemente de agentes que quelan el ion calcio. El plasma también puede ser extraído mediante plasmaféresis.

Sobre este gel basado en plasma y fibroblastos cultivados se pueden sembrar  
15 posteriormente queratinocitos, estas células sembradas a baja densidad sobre su superficie y cultivadas durante 8-12 días, en presencia de alguno de los diferentes medios que se emplean en el cultivo de queratinocitos; crecen y son capaces de formar un epitelio estratificado. Esta piel compuesta por el gel de plasma/fibroblastos y el epitelio cultivado autólogo podría ser utilizada en la epitelización definitiva de  
20 grandes quemados. También si se utiliza con epitelio de donante, podría ser utilizada como cobertura temporal de quemaduras o como terapia en úlceras cutáneas crónicas. Este sistema de cultivo también puede aplicarse a otros epitelios humanos diferentes de la piel permitiendo generar otros tejidos epiteliales tales como mucosa oral, mucosa vesical...

25 Este prototipo puede ser trasplantado al lecho de una herida, prender en el mismo y epitelizar definitivamente la lesión.

Para ser utilizado, este tipo de geles puede precisar ser fijado previamente a un soporte sólido que posibilite su manejo para trasplante. Este soporte puede ser una gasa, vaselinada ó no. La fijación de la gasa al gel puede hacerse mediante el  
30 empleo de una cola inorgánica inerte de uso clínico u otro tipo de fijación mecánica. También puede utilizarse una membrana de silicona como soporte, en cuyo caso esta fijación puede realizarse mediante una cola orgánica tipo fibrina. En estas ultimas condiciones este tipo de geles puede utilizarse sin capa de queratinocitos como cobertura temporal de lesiones cutáneas, aportando una base dérmica a la lesión.

35 Las ventajas de los geles de plasma humano y fibroblastos son las siguientes:



- Obtención fácil de la materia prima. El plasma se consigue a partir de sangre total humana extraída mediante venopunción, normalmente en presencia de un quelante de calcio. Para obtener plasma a partir de sangre total sólo se precisa una centrifugación. El plasma humano también podría ser obtenido a partir de sangre total mediante el procedimiento de aféresis
- Permiten un crecimiento rápido de los queratinocitos. En el interior del gel de plasma los fibroblastos crecen rápidamente y son capaces de potenciar el crecimiento de los queratinocitos, incluso cuando los fibroblastos están a una concentración inicial extremadamente baja. En los geles de plasma y fibroblastos, estas células crecen segregando sustancias que los convierten en auténticas células "feeder" que dirigen y estimulan el crecimiento de los queratinocitos. El cultivo de queratinocitos sobre este tipo de geles permite alcanzar en 3-4 semanas desde la toma de la biopsia una superficie total de piel cultivada superior a la alcanzada por los métodos descritos hasta ahora.
- El gel no presenta retracción alguna que reduzca su superficie y su volumen total en los primeros 30 días de cultivo.
- La posibilidad de sustituir los fibroblastos dérmicos por células de otro origen. En los geles realizados a partir de plasma, la función de los fibroblastos puede ser sustituida por otras células. Las células madre de mesénquima que se encuentran en la médula ósea (Young et al, J Ortho Res 16: 406-413, 1998) pueden ejercer como fibroblastos cuando son sembradas en el interior de estos geles. Otras células que también pueden incrementar el crecimiento de los queratinocitos, son las células endoteliales. El uso de células dérmicas de regiones diferentes a la piel representa una novedosa alternativa sobre todo para los pacientes grandes quemados, en que la disponibilidad de piel para el inicio de los cultivos celulares está seriamente limitada.
- La posibilidad de realizar la cascada de coagulación sin añadir ninguna proteína iniciadora extraña (trombina bovina o humana). El plasma humano, a diferencia de los concentrados de fibrinógeno, tiene todos los componentes de la cascada de la coagulación, incluida la trombina que está presente en forma de su precursor (inactivo) protrombina. La coagulación y por tanto, la formación de la dermis artificial, se puede realizar utilizando exclusivamente la vía intrínseca; mediante la adición de calcio y en presencia de fosfolípidos de origen plaquetario (también presentes como se comenta en el apartado siguiente). La utilización de esta vía para realizar la coagulación hace que se pueda prescindir de trombina

extraña, necesaria cuando se trabaja con concentrados de fibrinógeno. Mediante el uso del plasma en presencia de plaquetas es posible, por primera vez, que el origen de todas las proteínas de la dermis artificial procedan exclusivamente del paciente al que posteriormente se trasplantarán.

- 5 • El enriquecimiento en factores de crecimiento de origen plaquetario. El gel producido a partir de la coagulación directa del plasma posee parte de los factores de crecimiento y adhesión celular de los geles de fibrina, pero también están presentes las citoquinas plaquetarias, ya que tras la centrifugación siempre están presentes una fracción de estas células. Además podemos enriquecer la
- 10 fracción plaquetaria del plasma modificando los parámetros de centrifugación. La presencia de plaquetas hace que nuestra dermis sea muy rica en PDGF y TGF-B (Anitúa E, Int Oral Maxillofac Implants 14: 529-535, 1999), ambos factores claves en el inicio de la reparación tisular (Marx et al, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 85: 638-646, 1998). Todo esto hace que los geles realizados a
- 15 partir de plasma humano y plaquetas y poblados de fibroblastos conservan y aumentan la capacidad de los geles de fibrina para obtener grandes superficies de piel artificial cultivadas en un periodo de tiempo relativamente corto, lo que los hace aptos para cultivo de queratinocitos para tratamiento de grandes quemados. El crecimiento celular tanto de los fibroblastos en el interior de la fibrina como de
- 20 los queratinocitos sembrados en su superficie, es tan importante que a partir de una mínima biopsia es posible obtener células suficientes, tanto para el componente dérmico como para el epidérmico. Es decir que el componente celular de nuestra piel artificial proceda exclusivamente del paciente al que posteriormente va a ser trasplantado.
- 25 • El uso de plasma permite producir geles estables a una concentración muy baja de fibrinógeno. La concentración de fibrinógeno necesario para que el gel mantenga su integridad durante toda la fase del cultivo puede ser inferior a 0.5 mg por ml. Incluso a estas concentraciones los geles realizados a partir de plasma son estables y no son digeridos rápidamente por los fibroblastos y
- 30 queratinocitos sembrados en él. También si se asocia a un producto antifibrinolítico (aprotinina, ácido tranexámico, ácido epsilon-aminocaproico) la concentración de fibrinógeno se puede rebajar aún más, con lo que a partir de 2-3 ml de plasma podemos llegar a obtener hasta 70-90 cm<sup>2</sup> de superficie dérmica. La concentración total de plasma se podría reducir mas aun asociando al gel de
- 35 plasma alguna estructura que le sirva de almacén (vicril, ácido poláctico-

poliglicólico...). Otra ventaja de estos geles (al trabajar con mínimas cantidades de plasma por  $\text{cm}^2$  de gel) es que es posible que el plasma utilizado en la dermis artificial proceda del mismo enfermo. El uso de plasma del propio enfermo, unido a la ausencia de proteínas extrañas en la dermis más la posibilidad de que todas las células de la piel artificial procedan del paciente añade una de las grandes novedades a esta invención ya que por primera vez es posible el tratamiento de grandes superficies quemadas, mediante piel artificial en la que todos los componentes que forman parte de la misma procedan del paciente al que previamente se le extrajeron. Es decir, el tratamiento de grandes quemados con una piel artificial completamente autóloga

Por sus características biológicas, estos geles pueden servir de soporte a células (fibroblastos u otras estirpes celulares, incluyendo células genéticamente modificadas) con capacidad de producir proteínas útiles (factores de crecimiento endotelial, etc.) en diversas patologías.

#### 15 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra un esquema de las operaciones necesarias para el trasplante de piel a un gran quemado utilizando la dermis artificial objeto de la invención.

#### **Descripción detallada de la invención**

La obtención de los principales componentes de la base dérmica se describe a continuación.

El plasma con plaquetas (2) se obtiene a partir de la sangre total (4), esta es extraída mediante venopunción en presencia de un anticoagulante de uso clínico, especialmente de un anticoagulante que actúe mediante la quelación de la concentración del  $\text{Ca}^{++}$  ionizado que hay en la sangre total. La sangre total (4) puede ser obtenida en una bolsa de las utilizadas habitualmente en Hemoterapia o bien en el caso de pequeños volúmenes, a partir de sangre recogida en pequeños contenedores tipo Vacutainer ®. La obtención del plasma con plaquetas (2) se hará mediante centrifugación, a baja velocidad para obtener un plasma muy rico en plaquetas o directamente a alta velocidad para obtener un producto con menor componente de estas células. Una vez centrifugada la sangre, la fracción de plasma correspondiente se recogerá y se utilizará directamente para la formación del gel o bien se congelará a  $-20^{\circ}\text{C}$  para una posterior utilización. También previo a dicho almacenamiento el plasma puede ser tratado con azul de metileno para inactivar posibles virus si el plasma no se va a utilizar de forma autóloga (es decir, obtenido del propio paciente).

El gel se realiza a partir del fibrinógeno presente en el plasma bien mediante la adición de trombina humana o bovina e iones calcio, o bien exclusivamente utilizando la protrombina que está presente en el propio plasma, mediante la adición de Calcio, preferentemente en forma de cloruro cálcico para reconstituir los valores de calcio iónico que espontáneamente hay en el plasma y que habían sido anulados mediante el citrato sódico o el EDTA utilizados como anticoagulantes. La fibrina es el principal componente estructural del gel pero no el único ya que en este modelo la fibrina está covalentemente unida a la fibronectina plasmática. También es importante reseñar que existen otras múltiples proteínas en el plasma humano, albúmina, globulinas, factores de crecimiento, plasminógeno... que intervienen en la formación y estabilidad del gel y en el crecimiento de las células que en él se cultivan.

Los fibroblastos humanos pueden utilizarse de varias fuentes:

- 1) Fibroblastos homólogos. Cultivados a partir de prepucios obtenidos por intervenciones de fimosis y/o fibroblastos dérmicos procedentes de adultos sanos. Es necesario contar con la previa autorización del uso de los mismos del paciente o de sus representantes legales.
- 2) Fibroblastos autólogos. Los obtenidos a partir de una biopsia de piel (5) extraída a un paciente (8) y que serán exclusivamente utilizados en las dermis destinadas a ser implantadas en dicho paciente.

El gel se obtiene de la siguiente manera:

Por una parte, se resuspenden los fibroblastos en medio de cultivo o en solución de cloruro sódico 0.9%. A esta solución se le añade el volumen de plasma y posteriormente el agente antifibrinolítico. Una vez preparada esta solución se gelifica mediante 2 formas diferentes:

- 1) Añadiendo una solución de cloruro cálcico al 1% disuelto en cloruro sódico al 0.9%.
- 2) Añadiendo a la mezcla una solución de trombina (entre 2 y 4 unidades) disuelta en cloruro de calcio 40 mM.

Mediante la primera vía se utilizan los factores de coagulación presentes en el plasma que se activan por la presencia de Ca. Es un proceso lento que a la larga hará que la protrombina presente en el plasma pase a trombina actuando esta proteína sobre el fibrinógeno que lo transformará a fibrina y posteriormente mediante la acción de otros factores de la coagulación a fibrina insoluble, principal proteína estructural de nuestra dermis.

La segunda alternativa es la adición directa de trombina al plasma con lo que el

proceso se acelera rápidamente. Como contrapartida se añade al preparado otra proteína de origen humano o bovino con los consiguientes problemas de posible transmisión de enfermedades.

La mezcla se introduce en un frasco de cultivo celular y se deja durante 30-120 minutos a 37°C hasta la completa formación del gel. Al cabo de este tiempo, el gel se ha solidificado pudiendo cubrirse con medio de cultivo completo.

Los geles producidos se guardan a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% hasta su utilización para cultivo de queratinocitos un máximo de 14 días. En las condiciones habituales de cultivo estos geles permanecen estables y adheridos a la base del frasco de cultivo sin observarse retracciones ni pérdidas de volumen.

Si se desea obtener un cultivo de piel completa (7), sobre este lecho dérmico se añadirán los queratinocitos (6) obtenidos a partir de un cultivo primario. Estas células pueden cultivarse de muy diferentes maneras, en presencia de células "feeder", utilizando medios bajos en calcio o mediante el empleo de medios completamente definidos (Myers et al, Am J Surg 170: 75-83, 1995). Los queratinocitos (6) producidos con cualesquiera de estos sistemas pueden ser utilizados sobre esta dermis artificial (1).

Una vez que los queratinocitos sembrados están preconfluentes o completamente confluentes, los geles están listos para su empleo en clínica y se procede a su montaje y preparación para el trasplante. Este paso puede realizarse mediante fijación a un soporte que permita el transporte del gel sin pérdida ni rotura hasta el lugar del trasplante, o bien en el caso de geles de gran espesor directamente evitando esta fijación. En general, cuando se precisa una gran expansión del cultivo de queratinocitos en un corto periodo de tiempo (grandes quemados) se utilizarán geles de reducido volumen que precisarán de un soporte sólido (9) para ser trasplantados. Los cultivos destinados a otros usos (úlceras crónicas) podrán ser manejados y trasplantados sin esta fijación. La fijación a este soporte sólido se realiza empleando una cola inorgánica de uso clínico mediante la aplicación de mínimos puntos de sutura. Una vez fijado el cultivo al soporte se procede a separarlo de la base del frasco de cultivo mediante tracción manual.

Como fuente de plasma con plaquetas (2) se utiliza sangre total (4) humana extraída por venopunción en presencia de anticoagulantes.

Si se desean obtener grandes volúmenes de plasma a partir de un solo donante se realizará una extracción utilizando una bolsa de extracción de sangre de 450 ml de capacidad, conteniendo una solución anticoagulante/conservante (SAG-Manitol),

- normalmente de las denominadas bolsas triples. Una vez extraída, la sangre total se centrifuga. Si queremos que nuestro plasma sea rico en plaquetas (PRP) se realizará una centrifugación suave (orientativo a 1500 g durante 5 minutos a 20°C). Si se desea una menor riqueza en plaquetas (PPP) la centrifugación será enérgica
- 5 (orientativo 2900-3000 g durante 10 minutos) Una vez realizada la centrifugación se separa el plasma resultante mediante el fraccionamiento normal de la bolsa de sangre. El plasma así obtenido se puede emplear directamente, proceder a su inactivación viral mediante tratamiento con azul de metileno. Este plasma se puede conservar al menos durante un año a -20°C.
- 10 Si lo que precisamos son pequeños volúmenes de plasma para realizar pequeñas superficies de dermis la extracción de la sangre completa se realizará en tubos al vacío estériles (tipo Vacutainer<sup>R</sup>) u otros modelos de similares características, usando como solución anticoagulante un quelante del calcio en condiciones de saturación (citrato sódico, EDTA) en las proporciones recomendadas por el fabricante. También
- 15 puede utilizarse algún otro tipo de anticoagulante (heparina sódica). Según se requiera PPR ó PPP se realizarán las centrifugaciones a 160 g (PRP) ó a 400 g (PPP) durante 10 minutos. Se retira del tubo la fracción de plasma con plaquetas (2), procurando no extraer los hematíes. Para aumentar el rendimiento en la extracción del plasma, el pellet conteniendo el resto de la fracción celular, se centrifuga
- 20 entonces a 3.000 g durante 10 minutos. Finalizada esta operación se retira el plasma y se mezcla con el sobrenadante obtenido en la centrifugación anterior. Como normalmente este sistema de cultivo va a ser empleado en la producción de dermis destinadas a trasplantarse al paciente de donde procede la sangre (plasma autólogo) se puede prescindir del tratamiento con azul de metileno.
- 25 Sea cual sea el método escogido para la obtención de la sangre total y la separación del plasma se medirá el fibrinógeno disuelto en el mismo mediante un método comercial derivado del método inicialmente descrito por Kraus (Multifibren<sup>R</sup> U, Dade Behring).
- Diversas líneas de fibroblastos (3) humanos se obtendrán a partir de prepucios
- 30 humanos obtenidos tras cirugía programada de fimosis o a partir de una biopsia de piel (5). La pieza es recogida en medio de transporte (DMEM, suero fetal de bovino 10%, penicilina 100 u/ml, estreptomycin 100 µg/ml). En el laboratorio se lava 3 veces en PBS estéril y se trocea cuidadosamente, se coloca en 30 ml de solución de tripsina 0.05%- EDTA 0.02 % bajo agitación a 37°C. Cada 30 minutos se recoge la
- 35 tripsina y se cambia por tripsina fresca. La tripsina es neutralizada mediante la

- adición de medio de cultivo completo (DMEM, 10% suero bovino fetal). Se repite la operación hasta que no se obtengan más células. Las células obtenidas se colocan en un frasco de cultivo a una densidad de 100.000 células por cm<sup>2</sup> de superficie de cultivo. Cada 72 horas se cambia el medio hasta que las células estén confluentes. A
- 5 la confluencia las células son tripsinizadas y se realizan cultivos secundarios en proporción de crecimiento de dos frascos de cultivo por un frasco de cultivo del pase anterior. A partir de que las células muestren una monocapa de células semejantes a los fibroblastos (3) una parte de las mismas se congelan, según técnica habitual y se guardan en crioviales en nitrógeno líquido. Los pases idóneos para la utilización de
- 10 estos fibroblastos son entre el 4º y el 12º.
- Cuando se vayan a emplear en la dermis artificial (1) fibroblastos (3) humanos del propio paciente (8) se procederá del mismo modo descrito. La biopsia de piel (5) del paciente (8) se procesará como se describe en el apartado anterior. Una vez obtenidas las células parte de las mismas se cultivarán en DMEM 10% suero bovino
- 15 fetal a una densidad de 100.000 células por cm<sup>2</sup>. Se realizarán los correspondiente subcultivos hasta que consigamos un número suficiente de fibroblastos (3) humanos para la fabricación de la dermis artificial (1) que precise el paciente (8).
- Los fibroblastos (3) humanos cultivados se tripsinan, se cuentan y se resuspenden en medio de cultivo hasta su inmediata utilización en la dermis artificial (1).
- 20 Una vez obtenidos los materiales básicos se procede a la elaboración del gel.
- El cálculo proporcionado es el empleado en la fabricación de una base dérmica suficiente para un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Para otras dimensiones se utilizarán los mismos valores reduciéndolos o ampliándolos proporcionalmente a la superficie del frasco de cultivo.
- 25 Preparación de la dermis artificial (1):
- Se prepara una solución que contiene básicamente medio de cultivo, solución de cloruro sódico al 0.9% y fibroblastos (3) humanos (entre 30.000 y 250.000 células), a esta solución se le añade, si precisa el antifibrinolítico, (10.000 U de aprotinina, entre 5 y 20 mg de ácido tranexámico o 200-800 mg de ácido epsilon-aminocaproico) y
- 30 finalmente 1 ml de solución de Cl<sub>2</sub>Ca 0.04 M en los que previamente se ha disuelto entre 2 y 4 UI de trombina. Una vez mezclados estos componentes se les añade entre 3 y 6 ml de plasma con plaquetas (2) (dependiendo de la concentración de fibrinógeno). El volumen final se ajusta a 15 ml mediante el uso de más o menos cloruro sódico, dependiendo del volumen de plasma empleado La solución es puesta
- 35 rápidamente en el frasco de cultivo distribuyéndose homogéneamente por su

superficie. El frasco se deja en estufa de CO<sub>2</sub> a 37° hasta que el coágulo se produzca y el gel se polimerice.

Como alternativa al uso de trombina exógena, el gel se puede realizar de la siguiente manera:

- 5 Se prepara una solución que contiene básicamente medio de cultivo, solución de cloruro sódico al 0.9% y fibroblastos (3) humanos (entre 30.000 y 250.000 células), a esta solución se le añade, si precisa, el antifibrinolítico (10.000 U de aprotinina, entre 5 y 20 mg de ácido tranexámico o 200-800 mg de ácido epsilon-aminocaproico) y finalmente 1 ml de solución de Cl<sub>2</sub>Ca al 1% disuelto en cloruro sódico 0.9%. Una vez  
10 mezclados estos componentes se les añade el plasma con plaquetas (2) humano. El volumen final se ajusta a 15 ml mediante el uso de más o menos cloruro sódico, dependiendo del volumen de plasma empleado. La solución es puesta rápidamente en el frasco de cultivo distribuyéndose homogéneamente por su superficie. El frasco se deja en estufa de CO<sub>2</sub> a 37° hasta que el coágulo se produzca y el gel se  
15 polimerice. Si se actúa de esta manera la polimerización del gel se produce muy lentamente.

La concentración final aproximada de fibrinógeno en el gel es de entre 0.4 y 2 mg de fibrinógeno/ml de gel. Aunque en algunas condiciones se puede utilizar el plasma sin  
20 previa dilución con solución de cloruro sódico con lo que la concentración de fibrinógeno podría llegar hasta 4 mg/ml de gel.

La concentración inicial de fibroblastos (3) humanos en el gel puede ser muy variable. En general se recomienda una concentración no inferior a los 500 fibroblastos/cm<sup>2</sup> de superficie de gel, aunque también puede ser muy superior, aunque no se recomienda un número inicial de fibroblastos superior a 4.000/cm<sup>2</sup>, ya que con mayores  
25 concentraciones los geles tienden a ser digeridos a partir del 6°-7° día de cultivo, no pudiendo ser procesado para trasplante.

Los queratinocitos se siembran sobre este gel a una densidad extremadamente variable (entre 1.500 y 15.000 células/cm<sup>2</sup> de dermis) dependiendo del grado de expansión requerido.

- 30 Como queratinocitos (6) se pueden emplear los obtenidos a partir de un cultivo primario procedente de la biopsia de piel (5). El cultivo de queratinocitos (6) sobre este gel, puede realizarse mediante el empleo de cualquiera de los medios y sistemas de cultivo de queratinocitos que previamente han sido descritos, aunque los mejores resultados se han conseguido con los medios suplementados con suero fetal  
35 de bovino.



Cuando los queratinocitos sembrados están confluentes o preconfluentes, normalmente a partir del 8º día de cultivo, se prepara la lámina para el trasplante. Para ello es necesario despegar la lamina de piel artificial (7) de la base del frasco de cultivo, bien previa a la fijación a un soporte sólido o bien directamente. La fijación a un soporte sólido (9) se hace necesaria cuando los geles presentan una escasa consistencia (concentración inicial baja en fibrinógeno, grandes expansiones...) que hace que sin la fijación a un soporte sólido el manejo de los mismos para uso clínico sea imposible. Este procedimiento consta de las siguientes etapas:

Se retira el último medio de cultivo empleado y se abre el frasco de cultivo. El gel se recubre de una gasa estéril (vaselinada o no) de forma que la gasa recubra exactamente toda la superficie del gel. Mediante un bisturí se despegan los laterales del gel del frasco de cultivo. Una vez efectuada esta maniobra la gasa se fijará a la superficie superior del gel (la cara donde están los queratinocitos) mediante el empleo de un pegamento inorgánico (Cyanoacrylate, Histoacryl<sup>R</sup>, Braum u otro de similares características). El cyanoacrylate se empleará aplicando pequeñas gotas del mismo a los bordes del gel, también se pueden dejar diversos puntos de pegamento por el centro del mismo. Una vez secado el pegamento y con la ayuda de una espátula se procederá a despegar el gel del frasco de cultivo. La gasa ayuda a mantener integro el gel que contiene la base dérmica y la capa superior de queratinocitos cultivados. Mediante esta simple preparación se puede transportar este prototipo sin pérdida de su integridad ni rotura alguna, durante más de 16 horas. En la tabla I se comparan la técnica anterior y la dermis artificial objeto de la invención en cuanto a sus características básicas.

TABLA I

	TECNICA ANTERIOR (Sadaki)	INVENCION
Plaquetas	NO	SI
Trombina	SI	NO OBLIGATORIA
Fibrinógeno	60 mg/ml	0.5-2 mg/ml
Fibroblastos	50.000/cm <sup>2</sup>	< 4.000/cm <sup>2</sup>
Tiempo de cultivo del gel	22 h.	8 a 12 días
Crecimiento celular en gel	MÍNIMO	SI
Queratinocitos	50.000/cm <sup>2</sup>	1.500-15.000 /cm <sup>2</sup>
Expansión biopsia	X 83	X 1000- 5000

## REIVINDICACIONES.

- 1.- Dermis artificial (1) de las que utilizan una matriz obtenida por gelificación de plasma humano, caracterizada por que la citada gelificación se produce en presencia de plaquetas mediante la adición de sales de calcio, y porque en la misma se  
5 siembran células dérmicas.
- 2.- Dermis artificial (1) según la reivindicación 1, caracterizada por que durante la gelificación se añade trombina.
- 3.- Dermis artificial (1) según la reivindicación 2, caracterizada por que la trombina se añade en una concentración de 0.2 UI/ml.
- 10 4.- Dermis artificial (1) según la reivindicación 1, caracterizada por que las sales de calcio están constituidas por  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1% en disolución de 1 ml por cada 3 a 6 ml de plasma con plaquetas (2).
- 5.- Dermis artificial (1) según la reivindicación 1, caracterizada por que el plasma con plaquetas (2) sufre una inactivación viral.
- 15 6.- Dermis artificial según la reivindicación 1, caracterizada por que se añade un polímero biocompatible.
- 7.- Dermis artificial según la reivindicación 1, caracterizada por que las células dérmicas son fibroblastos (3).
- 8.- Dermis artificial según la reivindicación 1, caracterizada por que se utilizan células  
20 madre de mesénquima como células dérmicas u otro tipo celular (endoteliales...)
- 9.- Utilización de una dermis artificial (1) según reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por el cultivo de queratinocitos (6) humanos en su superficie para constituir una piel artificial (7) apta para el trasplante.
- 10.- Utilización de una dermis artificial (1), según reivindicaciones 1 a 8, caracterizada  
25 por el cultivo de otras células epiteliales (orales, urogenitales...) en su superficie para constituir un epitelio artificial (mucosa oral, mucosa vesical...) apto para el trasplante.
- 11.- Método de obtención de una dermis artificial (1) caracterizado por comprender las siguientes etapas;  
obtención de plasma con plaquetas (2), mediante centrifugación ligera de sangre total  
30 (4) de un paciente (8) y congelación subsiguiente,  
cultivo de células dérmicas a partir de una biopsia de piel (5) por métodos conocidos, gelificación del plasma con plaquetas (2), previamente descongelado, mediante la adición de sales de calcio, para obtener una matriz de fibrina, sembrando células dérmicas, por ejemplo fibroblastos (3), en el interior de la fibrina.

1/1

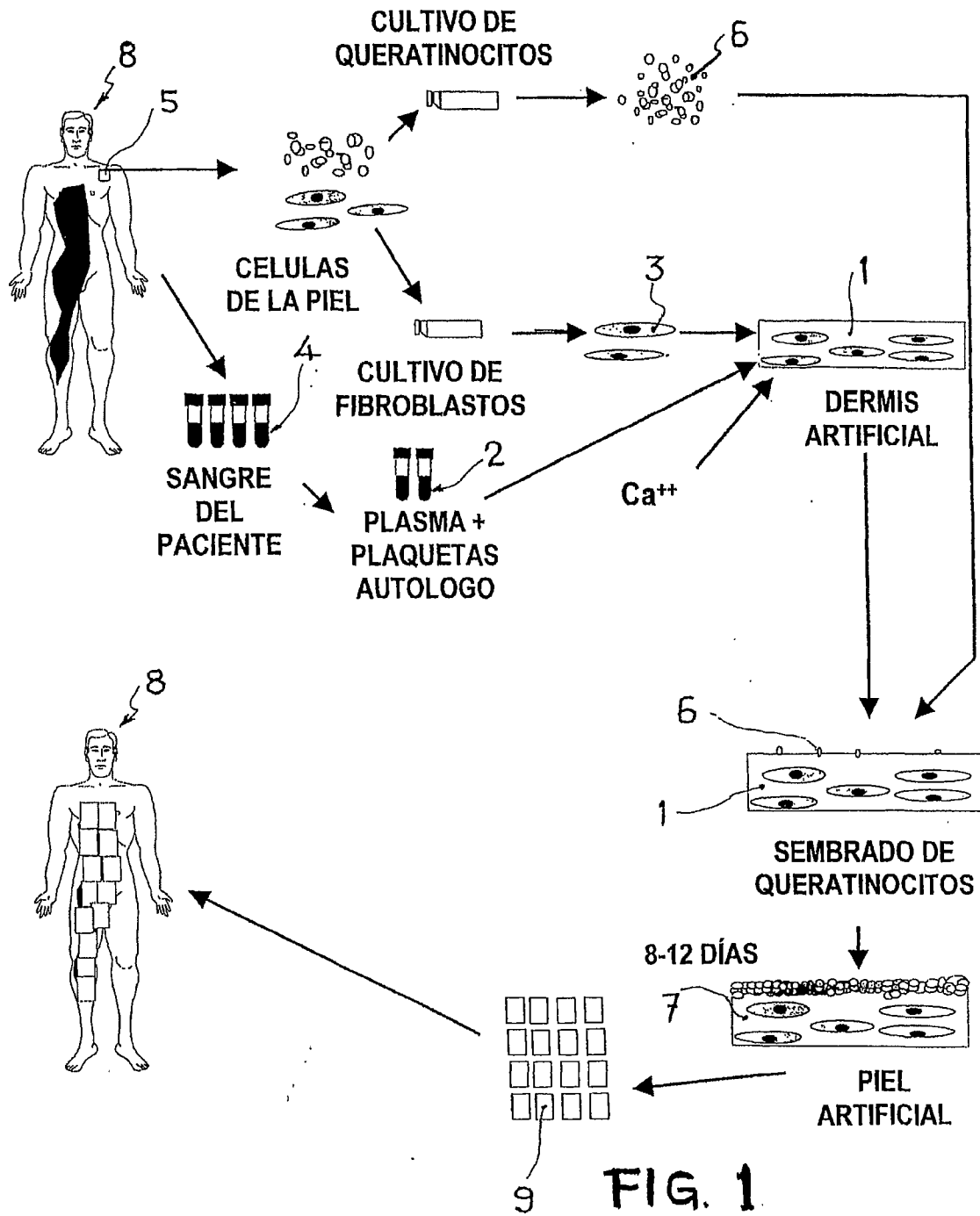


FIG. 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 02/00087

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/08, A61L27/60, A61F2/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61L A61F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10277143 A (UNIV. TOKAI GH)20.10.1998 ( <b>abstract</b> ) WPI [ <b>in line</b> ]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [ <b>retrieved on 22.03.2002</b> ]. <b>Retrieved on</b> EPOQUE, EPO. DW 199901, N° de acces 1999-003151	1-11
A	ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, <b>the whole document</b>	1-11
A	ES 2117573 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1998, <b>the whole document</b>	1-11
A	EP 0373044 A1 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 13.06.1990, <b>the whole document</b>	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 2002 (25.03.2002)

Date of mailing of the international search report

9 April 2002 (09.04.2002)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 02/00087

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2132027 A1	01.08.1999	NONE	
ES 2117573 A1	01.08.1998	NONE	
EP 0373044 A1	13.06.1990	FR 2639958 A AT 113071T T DE 68918922D D ES 2060803T T DE 68918922T T US 5474770 A	08.06.1990 15.11.1994 24.11.1994 01.12.1994 20.04.1995 12.12.1995

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ ES 02/00087

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C12N5/08, A61L27/60, A61F2/10

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> C12N A61L A61F

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	JP 10277143 A (UNIV. TOKAI GH) 20.10.1998 (resumen) WPI [en línea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado el 22.03.2002]. Recuperado de EPOQUE, EPO. DW 199901, N° de acceso 1999-003151	1-11
A	ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, todo el documento	1-11
A	ES 2117573 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1998, todo el documento	1-11
A	EP 0373044 A1 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 13.06.1990, todo el documento	1-11

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 25 Marzo 2002 (25.03.2002)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

- 9 ABR 2002

- 9. 04. 02

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

Alfonso Maquedano

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
n° de fax +34 91 3495304

n° de teléfono + 34 91 3495474

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
 Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº  
 PCT/ES ES 02/00087

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2132027 A1	01.08.1999	NINGUNO	
ES 2117573 A1	01.08.1998	NINGUNO	
EP 0373044 A1	13.06.1990	FR 2639958 A AT 113071T T DE 68918922D D ES 2060803T T DE 68918922T T US 5474770 A	08.06.1990 15.11.1994 24.11.1994 01.12.1994 20.04.1995 12.12.1995